

The Delphion Integrated View

Buy Now: PDF | File History | Other choices

Tools: Add to Work File Create new Work File

View: Expand Details | INPADOC | Jump to: Top

Go to: Derwent

Email this to a friend

Title: **EP0464533A1: Fusionproteins with parts of immunoglobulins, their production and use**[German]French]

[Derwent Title]

Country: EP European Patent Office (EPO)

Kind: A1 APPLICATION PUBLISHED WITH SEARCH REPORT (See also: EP0464533B1)

Inventor: Lauffer, Leander, Dr.;
Oquendo, Patricia, Dr.;
Zettmeissl, Gerd, Dr.;
Seed, Brian, Dr.;

Assignee: BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
News, Profiles, Stocks and More about this company

Published / Filed: 1992-01-08 / 1991-06-22

Application Number: EP1991000110307

IPC Code:

Advanced: A61K 38/00; A61K 39/395; A61P 7/04; A61P 9/00;
A61P 13/12; A61P 37/02; A61P 37/08; C07K 1/22; C07K 14/005;
C07K 14/195; C07K 14/47; C07K 14/505; C07K 14/52; C07K 14/53;
C07K 14/535; C07K 14/54; C07K 14/545; C07K 14/55; C07K 14/705;
C07K 14/71; C07K 14/715; C07K 14/745; C07K 16/00; C07K 19/00;
C12N 5/10; C12N 9/64; C12N 15/09; C12N 15/62; C12P 21/02;
G01N 33/15; G01N 33/50; G01N 33/68; C12R 1/91;
Core: A61P 7/00; A61P 13/00; A61P 37/00; C07K 1/00; C07K 14/435;
more
IPC-7: A61K 37/02; A61K 39/395; C07K 15/06; C12N 15/62;
ECLA Code: C12N9/64F2C21M90; C07K14/47; C07K14/505; C07K14/715F;
C07K14/745; C07K16/00; C12N15/62; K61K38/00; M07K207/00;
M07K319/00; M07K319/32; M07K319/30; M07K319/50;

Priority Number: 1990-06-28 DE1990004020607

Abstract: The invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins consisting of human proteins or parts thereof not belonging to the immunoglobulin family and various portions of the constant region of immunoglobulin molecules. The functional properties of both fusion components are surprisingly retained in the fusion protein. [German]

INPADOC Legal Status:

Designated

Country:

Family:

First Claim:
Show all claims

Description
Expand description

Show legal status actions Buy Now: Family Legal Status Report

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Show 39 known family members

1. Lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörenden humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen von Immunglobulinmolekülen aller Subklassen.

Die Erfindung betrifft gentechnisch erzeugte lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörenden humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen der konstanten Region von Immunglobulinmolekülen. Die funktionellen Eigenschaften beider Fusionspartner bleiben überraschenderweise im Fusionsprotein erhalten.



High Resolution
Low Resolution
21 pages



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 464 533 B1

(12) EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung: 29.07.1998 Patentblatt 1998/31
(51) Int Cl. C07K 16/00, C12N 15/62,
A61K 38/00, A61K 39/395

(21) Anmeldenummer: 91110307.5

(22) Anmeldetag: 22.06.1991

(54) Fusionsproteine mit Immunglobulinanteilen, ihre Herstellung und Verwendung
Fusionproteins with parts of immunoglobulins, their production and use
Protéines fusionnées avec des portions d'immunoglobulines, leurs production et utilisation

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(30) Priorität: 28.06.1990 DE 4020607

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.01.1992 Patentblatt 1992/02

(60) Teilanmeldung: 97120664.4 / 0 835 939

(73) Patentinhaber:
• HOECHST AKTIENGESellschaft
65926 Frankfurt am Main (DE)
• THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
Boston, MA 02114 (US)

(72) Erfinder:
• Lauffer, Leander, Dr.
W-3550 Marburg (DE)

• Oquendo, Patricia, Dr.
W-3550 Marburg (DE)
• Zettlmeisel, Gerd, Dr.
W-3551 Lahntal-Grossfelden (DE)
• Seed, Brian, Dr.
Boston, MA 02114 (US)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 269 455
EP-A- 414 178
EP-A- 418 014
EP-A- 325 262
EP-A- 417 563

• P.N.A.S. (1991) 88:10535

Bemerkungen:

Die Akte enthält technische Angaben, die nach dem
Eingang der Anmeldung eingereicht wurden und die
nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

EP 0 464 533 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet von gentechnisch erzeugten löslichen Fusionsproteinen bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen der konstanten Region von Immunglobulinmolekülen. Die funktionellen Eigenschaften beider Fusionspartner bleiben überraschenderweise im Fusionsprotein erhalten.

Aus der EP-A 0325 262 und der EP-A 0314 317 sind entsprechende Fusionsproteine bestehend aus verschiedenen Domänen des CD4-Membranproteins menschlicher T-Zellen und aus humanen IgG1-Anteilen bekannt. Einige dieser Fusionsproteine binden mit gleicher Affinität an das Glykoprotein gp120 des Humanen Immundefizienz-Virus wie das zellgebundene CD4 Molekül. Das CD4-Molekül gehört zur Immunglobulinfamilie und ist folglich bezüglich seiner Tertiärstruktur sehr ähnlich aufgebaut wie Immunglobulinmoleküle. Dies gilt auch für die α -Kette des T-Zell-Antigenrezeptors, für die solche Fusionen ebenfalls beschrieben wurden (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 84 (1987), 2937-2940). Aufgrund der sehr ähnlichen Domänenstruktur war deshalb in diesem Fall die Beibehaltung der biologischen Aktivität der beiden Fusionspartner im Fusionsprotein zu erwarten.

In der europäischen Patentanmeldung Nr. 0 417 583 sind DNA-Sequenzen beschrieben, die für eine Teilsequenz für lösliche Fragmente von nicht-löslichen Proteinen, die Tumornekrosefaktor (TNF) binden, kodiert. Zusätzlich ist dort eine andere Teilsequenz genannt, die für alle Domänen außer der ersten Domäne der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen wie IgG, IgA, IgM bzw. IgE kodiert.

Die nachveröffentlichte europäische Patentanmeldung Nr. 0 418 014 offenbart auf der Seite 8, Zeilen 18-25 chimäre Antikörpermoleküle, bei denen lediglich die variablen Domänen der Immunglobulinmoleküle durch TNF-R Sequenzen ersetzt wurden.

Gegenstand der Erfindung sind lösliche Fusionsproteine bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE.

Die Fusionsproteine können in bekannten pro- und eukaryontischen Expressionssystemen hergestellt werden, vorzugsweise jedoch in Säugerzellen (z.B. CHO-, COS-, BHK-Zellen).

Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine sind aufgrund ihres Immunglobulinanteils mittels Affinitätschromatographie leicht zu reinigen und besitzen verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften in vivo.

In vielen Fällen ist der Fc-Teil im Fusionsprotein für den Einsatz in Therapie und Diagnostik durchaus vorteilhaft und führt so z.B. zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (EP-A 0232 262).

Es existieren verschiedene Proteasen, deren Verwendung für diesen Zweck als denkbar erscheint. Pepsin oder Pepsin werden beispielsweise für die Erzeugung von F(ab)-Fragmenten aus Immunglobulinen eingesetzt (Immunology, Hrg. Rott, I. et al., Gower Medical Publishing, London (1989)), jedoch spalten sie nicht sonderlich spezifisch. Der Blutgerinnungsfaktor Xa hingegen erkennt in einem Protein die relativ seltene Tripeptidsequenz Ile-Glu-Gly-Arg und führt eine hydrolytische Spaltung des Proteins nach dem Argininrest durch. Spaltsequenzen, die das beschriebene Tetrapeptid enthalten, wurden zuerst von Nagai und Thogersen in ein Hybridprotein auf gentechnologischem Wege eingeführt (Nagai, K. und Thogersen, H.C., Nature, Bd. 309 (1984), 810-812). Diese Autoren konnten zeigen, daß die in E. coli exprimierten Proteine tatsächlich spezifisch von Faktor Xa gespalten werden. Aus Publikationen ist jedoch noch kein Beispiel bekannt, daß solche Proteine auch in eukaryotischen und insbesondere in Animalzellen exprimiert und nach ihrer Reinigung von Faktor Xa gespalten werden können. Eine Expression der erfindungsgemäßen Proteine in Animalzellen ist jedoch vorzuziehen, da nur in einem solchen Zellsystem die Sezierung von z.B. normalerweise membranständige Rezeptoren als Fusionspartner unter Beibehaltung ihrer nativen Struktur und damit ihrer biologischen Aktivität zu erwarten ist. Sezierung in den Zellkulturüberstand erleichtert die nachfolgende einfache Reinigung des Fusionsproteins.

Die Erfindung betrifft daher lösliche Fusionsproteine bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, und IgE. In einer besonderen Ausführungsform ist der Fc-Teil durch eine miteingegebte mittels Faktor Xa spaltbare Spaltsequenz auf einfache Weise abtrennbar.

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur gentechnischen Herstellung dieser Fusionsproteine sowie deren Verwendung für die Diagnostik und die Therapie.

Die folgenden Beispiele tragen zur Erläuterung der Erfindung bei. Sie stellen jedoch keine Ausführungsarten der Erfindung dar.

Beispiel 1: Thromboplastin-Fusionsproteine

Die Blutgerinnung ist ein Vorgang von zentraler Bedeutung im menschlichen Organismus. Entsprechend fein reguliert ist die Gerinnungskaskade, in der eine Vielzahl zellulärer Faktoren und Plasmaproteine zusammenwirken. Die Gesamtheit dieser Proteine (und deren Kofaktoren) wird als Gerinnungsfaktoren bezeichnet. Endprodukte der Gerinnungskaskade sind Thrombin, das die Aggregation von Blutplättchen (Platelets) induziert, und Fibrin, das den Plateletthrombus stabilisiert. Thrombin katalysiert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und wird selbst durch limitierte Proteo-

lyse von Prothrombin gebildet. Für diesen Schritt ist aktivierter Faktor X (Faktor Xa) verantwortlich, der in Gegenwart von Faktor Va und Calciumionen an Platemembranen bindet und Prothrombin spaltet.

Zwei Wege existieren zur Aktivierung von Faktor X, der extrinsische und der intrinsische "pathway". Im intrinsischen "pathway" wird eine Serie von Faktoren durch Proteolyse aktiviert, um jeweils selbst aktive Proteasen zu bilden. Im extrinsischen "pathway" wird Thromboplastin (Tissue Factor) von verletzten Zellen verstärkt synthetisiert und aktiviert Faktor X, zusammen mit Faktor VIIa und Calciumionen. Früher wurde angenommen, daß sich die Aktivität von Thromboplastin auf diese Reaktion beschränkt. Jedoch greift der Thromboplastin/VIIa-Komplex auf der Ebene von Faktor IX ebenfalls aktivierend in den intrinsischen "pathway" ein. Ein Thromboplastin/VIIa-Komplex ist also einer der wichtigsten physiologischen Aktivatoren der Blutgerinnung.

Es ist daher vorstellbar, daß Thromboplastin, abgesehen von seiner Verwendung als Diagnostikum (s.u.), auch als Bestandteil der Therapie zur Behandlung angeborener oder erworbener Blutgerinnungsdefizienzen eingesetzt werden kann. Beispiele hierfür sind chronische Hämophilien verursacht durch einen Mangel an Faktoren VIII, IX oder XI oder auch akute Störungen der Blutgerinnung als Folge von z.B. Leber- oder Nierenerkrankungen. Auch nach chirurgischen Eingriffen wäre der Einsatz eines solchen Therapeutikums dankbar.

Thromboplastin ist ein integrales Membranprotein, das nicht zur Immunglobulinfamilie gehört. Thromboplastin-cDNA-Sequenzen sind von insgesamt vier Gruppen veröffentlicht worden (Fisher et al., *Thromb. Res.*, Bd. 48 (1987), 89-99; Morrisey et al., *Cell*, Bd. 50 (1987), 129-135; Scarpati et al., *Biochemistry*, Bd. 26 (1987), 5234-5238; Spicer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Bd. 84 (1987), 5148-5152). Die Thromboplastin-cDNA beinhaltet einen offenen Leseramen, der für ein Polypeptid aus 295 Aminosäureresten kodiert, wovon die N-terminalen 32 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Reifes Thromboplastin besteht aus 263 Aminosäureresten und besitzt eine Drei-Domänen-Struktur: i) aminoterminal extrazelluläre Domäne (219 Aminosäurereste); ii) Transmembranregion (23 Aminosäurereste); iii) cytoplasmatische Domäne (Carboxyterminus; 21 Aminosäurereste). In der extrazellulären Domäne existieren drei potentielle Stellen für N-Glykosylierung (Asn-X-Thr). Thromboplastin ist normalerweise glykosyliert, jedoch scheint die Glykosylierung nicht essentiell für die Aktivität des Proteins zu sein (Faborsky et al., *Biochemistry*, Bd. 28 (1989), 8072-8077).

Thromboplastin wird als Zusatz zu Plasmaproben in der Gerinnungsdiagnostik benötigt. Durch die einstufige Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung (z.B. Quick-Test) läßt sich der Gerinnungsstatus der untersuchten Person feststellen. Das für die Diagnostik erforderliche Thromboplastin wird gegenwärtig aus humanem Gewebe gewonnen, wobei das Herstellungsverfahren schwer standardisierbar ist, die Ausbeute niedrig

liegt und erhebliche Mengen humanes Ausgangsmaterial (Plazenten) bereit gestellt werden müssen. Andererseits ist zu erwarten, daß auch die gentechnische Herstellung von nativem, membrangebundenem Thromboplastin, bedingt durch komplexe Reinigungsverfahren, problematisch sein wird. Diese Problematiken können durch die erfindungsgemäße Fusion an Immunglobulinanteile umgangen werden.

Die erfindungsgemäßen Thromboplastin-Fusionsproteine werden von Säugerzellen (z.B. CHO-, BHK-, COS-Zellen) ins Kulturmedium ausgeschleust, über Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose gereinigt und besitzen überraschend hohe Aktivität in der einstufigen Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung.

Klonierung von Thromboplastin-cDNA

Zur Klonierung der Thromboplastin-cDNA wurde die publizierte Sequenz von Scarpati et al., *Biochemistry*, Bd. 26 (1987), 5234-5238, benutzt. Hieraus wurden zwei Oligonukleotidsondenmoleküle (s. Fig.1) abgeleitet. Mit diesen beiden Sondenmolekülen wurde eine cDNA-Bank aus humanen Plazenta (Grundmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Bd. 83 (1986), 8024-8028) abgesucht.

Es wurden verschiedene lange cDNA-Klone erhalten. Ein Klon, 2b-Apr5, der für das weitere Vorgehen verwendet wird, kodiert für die gleiche Aminosäuresequenz, wie die in Scarpati et al. beschriebene cDNA. In Fig. 2 ist die Gesamtsequenz des Klons 2b-Apr5 mit der daraus abgeleiteten Thromboplastin-Aminosäuresequenz dargestellt.

Konstruktion eines für Thromboplastin-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pTF1Fc.

Das Plasmid pCD4E gamma 1 (EP 0 325 262 A2; hinterlegt bei ATCC unter der Nummer No. 67610) dient zur Expression eines Fusionsproteins aus humanem CD4-Rezeptor und humanem IgG1. Die für die extrazelluläre Domäne von CD4 kodierende DNA-Sequenz wird aus diesem Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI entfernt. Mit dem Enzym HindIII darf hierbei nur eine teilweise Spaltung durchgeführt werden, um nur bei einer der zwei in pCD4E gamma 1 enthaltenen HindIII-Stellen zu schneiden (Position 2198). Es liegt dann ein geöffnete Vektor vor, bei dem eine eukaryotische Transkriptionsregulationssequenz (Promotor) von der offenen HindIII-Stelle gefolgt wird. Die offene BamHI-Stelle liegt am Beginn der kodierenden Regionen für einen Pentapeptidlinker, gefolgt von den Hinge- und den CH2- und CH3-Domänen vom menschlichem IgG1. Der Leseramen in der BamHI-Erkennungssequenz GGATCC ist dergestalt, daß GAT als Asparaginsäure translatiert wird. DNA-Amplifizierung mit thermostabiler DNA-Polymerase ermöglicht eine gegebene Sequenz so zu verändern, daß an eines oder beide Enden beliebige Sequenzen angefügt werden. Zwei

Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region (A: 5' GATCGATTAAGCTTCGGGAACCGCTCGATCTGCCGCC 3') bzw. kodierenden Region (B: 5' GCATATCTGGATCCCGTAGAATATTTCTGTGAATTCGCC 3') der Thromboplastin-cDNA hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 3.

Nach erfolgter Amplifizierung liegt also ein DNA-Fragment vor (827 bp), das (bezogen auf den kodierenden Strang) am 5'-Ende vor dem Beginn der kodierenden Sequenz eine HindIII-Stelle, am 3'-Ende nach den Kodons für die ersten drei Aminosäurereste der Transmembranregion eine BamHI-Stelle enthält. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der Thromboplastin-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit HindIII und BamHI in den oben beschriebenen mit HindIII (partiell/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pTF1Fc (Fig. 4).

Transfektion von pTF1Fc in Säugerzellen

Das durch das Plasmid pTF1Fc kodierte Fusionsprotein wird im folgenden als pTF1Fc bezeichnet. pTF1Fc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pTF1Fc transfiziert (EP A 0325 262).

Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben ca. 25% als Anteil transfizierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Dieser Zellüberstand wurde nach weiteren drei Tagen geerntet.

Reinigung von pTF1Fc-Fusionsprotein aus Zellkulturüberständen

170 ml Überstand von transient transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in einem Batchprozeß bei 4°C mit 0,8 ml Protein-A-Sepharose in einer Säule gesammelt, mit 10 Volumen Waschlösung gewaschen (50mM Tris-Puffer pH 8,6, 150mM NaCl) und mit Elutionspuffer (100mM Citronensäure: 100mM NaCitrat 93:7) in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die ersten 9 Fraktionen wurden nach sofortiger Neutralisierung mit jeweils 0,1 ml 2M Tris-Puffer pH 8,6 vereinigt und das enthaltene Protein durch drei Zyklen Konzentration/Verdünnung im Amicon-Mikrokonzentratoren (Centricon 30) in TNE-Puffer (50mM Tris-Puffer pH 7,4, 50mM NaCl, 1mM EDTA) überführt. Das so erhaltene pTF1Fc ist in der SDS-PAGE elektrophoretisch rein (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). In Abwesenheit von Reduktionsmitteln verhält es sich in der SDS-PAGE wie ein Dimer (ca. 165

KDa).

Biologische Aktivität von gereinigtem TF1Fc in der Prothrombin-Geninnungszeitbestimmung

TF1Fc-Fusionsprotein ist in niedrigen Konzentrationen (> 50 ng/ml) in der einstufigen Prothrombin-Geninnungszeitbestimmung (Vinazzer, H. Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor (1979), Fisher Verlag, Stuttgart) aktiv. Die erzielten Gerinnungszeiten sind vergleichbar mit den Gerinnungszeiten, die mit Thromboplastin, das aus humaner Plazenta isoliert wurde, erhalten werden.

15 Beispiel 2: Interleukin-4-Rezeptor-Fusionsproteine

Interleukin-4 (IL-4) wird von T-Zellen synthetisiert und wurde ursprünglich als B-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, da es B-Zell-Proliferation stimulieren kann. Es übt eine Vielzahl von Effekten auf diese Zellen aus. Insbesondere ist dies das Anregen der Synthese von Molekülen der Immunglobulinunklassen IgG1 und IgE in aktivierten B-Zellen (Coffmann et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988) 5). Darüber hinaus reguliert IL-4 auch die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und anderen haematopoetischen Zellen. Es trägt somit zur Regulierung von allergischen und anderen immunologischen Reaktionen bei. IL-4 bindet mit hoher Affinität an einen spezifischen Rezeptor. Die cDNA, die für den humanen IL-4-Rezeptor kodiert, wurde isoliert (Idzarda et al., J.Exp.Med. Bd. 171 (1990) 861-873. Aus der Analyse der von der cDNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz geht hervor, daß der IL-4 Rezeptor aus insgesamt 825 Aminosäuren besteht, wobei die N-terminalen 25 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Rester humaner IL-4-Rezeptor besteht aus 800 Aminosäuren und besitzt wie Thromboplastin eine Dreidomänenstruktur: i) aminoterminaler extrazellulärer Domäne (207 Aminosäuren); ii) Transmembranregion (24 Aminosäuren) und iii) cytoplasmatische Domäne (569 Aminosäuren). In der extrazellulären Domäne existieren sechs potentielle Stellen für N-Glykosylierung (Asn-X-Thr/Ser). IL-4-Rezeptor besitzt Homologien zum humanen IL-6-Rezeptor, zur β -Untereinheit des humanen IL-2-Rezeptors, zum Maus-Erythropoietin-Rezeptor und zum Ratten-Prolaktinrezeptor (Idzarda et al., a.o.). Es ist somit wie Thromboplastin kein Mitglied der Immunglobulinfamilie, sondern wird zusammen mit den aufgeführten homologen Proteinen zur neuen Familie der Haematopoietinrezeptoren gerechnet. Mitgliedern dieser Familie sind 4 Cysteinstellen und eine sich in der Nähe der Transmembranregion befindliche konservierte Sequenz (Trp-Ser-X-Tyr-Ser) in der extrazellulären Domäne gemeinsam.

Aufgrund der beschriebenen Funktion des IL-4/IL-4-Rezeptorsystems ist ein therapeutischer Einsatz einer rekombinanten Form des IL-4-Rezeptors zur Unterdrückung IL-4-vermittelter Immunreaktionen (z.B.

Transplantationsabstoßungsreaktion, Autoimmun-krankheiten, allergische Reaktionen) möglich.

Die für eine Therapie erforderliche Substanzmenge machen eine gentechnische Herstellung solcher Moleküle notwendig. Erfindungsgemäß ist wegen der problematischen Reinigung durch Affinitätschromatographie und der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften die Synthese von löslichen Formen des IL-4-Rezeptors als Immunglobulinfusionsprotein besonders vorteilhaft.

Die IL-4-Rezeptor-Fusionsproteine werden von Säugerzellen (z.B. CHO-, BHK-, COS-Zellen) in das Kulturmedium ausgeschleust, über Affinitätschromatographie an Protein-A-Sephrose gereinigt und besitzen überraschenderweise identische funktionelle Eigenschaften wie die extrazelluläre Domäne des intakten membrangebundenen IL-4-Rezeptormoleküls.

Konstruktion eines für IL-4-Rezeptor-Fusionsproteine kodierenden Hybridplasmids pIL-4RFc.

Wird das Plasmid pCD4EGamma1 mit XhoI und BamHI geschnitten, liegt ein geöffneter Vektor vor, bei dem die offene XhoI-Stelle "downstream" von der Promotersequenz liegt. Die offene BamHI-Stelle liegt am Beginn der kodierenden Regionen für einen Pentapeptidlinker, gefolgt von den Hinge- und den CH2- und CH3-Domänen vom menschlichem IgG1. Der Leserahmen in der BamHI-Erkennungssequenz GGATCC ist dergestalt, daß GAT als Asparaginsäure translatiert wird. DNA-Amplifizierung mit thermostabiler DNA-Polymerase ermöglicht eine gegebene Sequenz so zu verändern, daß an eines oder beide Enden beliebige Sequenzen angefügt werden. Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region (A: 5' GATCCAGTACTCGAGAGAAGCCGGCGTGGTGGCTCATGC 3') bzw. kodierenden Region (B: 5, CTATGACATGGATCCTGCTGAAGGCTCCCTCGTAGGAGTGTGTG 3') der IL-4-Rezeptor-cDNA, die kloniert im Vektor pDC302/T22-8 vorliegt (Idzerda et al., a.a.O.), hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 5. Nach erfolgter Amplifizierung mittels thermostabiler DNA-Polymerase liegt ein DNA-Fragment vor (836 bp), das bezogen auf den kodierenden Strang am 5'-Ende vor dem Beginn der kodierenden Sequenz eine XhoI-Stelle, am 3'-Ende vor dem letzten Kodon der extrazellulären Domäne eine BamHI-Stelle enthält. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4EGamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der IL-4-Rezeptor-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit XhoI und BamHI in den oben beschriebenen mit XhoI/BamHI geschnittenen

Vektor pCD4EGamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pIL4RFc (Fig. 6).

Transfektion von pIL4RFc in Säugerzellen

Das durch das Plasmid pIL4RFc kodierte Fusionsprotein wird im folgenden als pIL4RFc bezeichnet. pIL4RFc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pIL4RFc transfiziert (EP A 0325 262). Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben ca. 25% als Anteil transfizierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Dieser Zellüberstand wurde nach weiteren drei Tagen geerntet.

Reinigung von IL4RFc-Fusionsprotein aus Zellkulturüberständen

500 ml Überstand von transient transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in einem Batchprozeß bei 4°C mit 1,6 ml Protein-A-Sephrose in einer Säule gesammelt, mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen (50mM Tris-Puffer pH 8,6, 150mM NaCl) und mit Elutionspuffer (100mM Citronensäure, 100mM NaCitrat 93:7) in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die ersten 9 Fraktionen wurden nach sofortiger Neutralisierung mit jeweils 0,1 ml 2M Tris-Puffer pH 8,6 vereinigt und das enthaltene Protein durch drei Zyklen Konzentration/Verdünnung im Amicon-Mikrokonzentrat (Centricon 30) in TNE-Puffer (50mM Tris-Puffer pH 7,4, 50mM NaCl, 1mM EDTA) überführt. Das so erhaltene IL4RFc ist in der SDS-PAGE elektrophoretisch rein (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). In Abwesenheit von Reduktionsmitteln verhält es sich in der SDS-PAGE wie ein Dimer (ca. 150 kDa).

Biologische Aktivität von gereinigtem IL4RFc

IL4RFc-Protein bindet ¹²⁵I-radiomarkiertes IL-4 mit gleicher Affinität (KD=0.5nM) wie membrangebundener, intakter IL-4-Rezeptor. Es hemmt die Proliferation der IL-4-abhängigen Zelllinie CTLL-L₂10-IFN γ Klon D (Idzerda et al., a.a.O.) in Konzentrationen von 10-1000 ng/ml. Darüber hinaus eignet es sich hervorragend für die Entwicklung von IL-4-Bindungstests, da es über seinen Fc-Teil an mit z.B. Kaninchen-antihuman-IgG beschichtete Mikrotiterplatten gebunden werden kann und in dieser Form ebenfalls mit hoher Affinität seinen Liganden bindet.

Beispiel 3: Erythropoietin-Fusionsproteine

Reifes Erythropoietin (EPO) ist ein aus 166 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das essentiell für die Entwicklung von Erythrozyten ist. Es stimuliert die Reifung und die terminale Differenzierung erythroider Vorläuferzellen. Die cDNA für humanes EPO wurde kloniert (EPA-0267 678) und kodiert für die 166 Aminosäuren

des reifen EPO und ein für die Sezernierung essentielles Signalpeptid von 22 Aminosäuren. Mit Hilfe der cDNA kann rekombinantes funktionelles EPO in gentechnisch veränderten Säugerzellen hergestellt werden und zur Therapie von anämischen Erscheinungen verschiedener Ursprungs (z.B. bei akuten Nierenversagen) klinisch eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß ist wegen der problemlosen Reinigung und der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften die Synthese von EPO als Immunglobulin-fusionsprotein besonders vorteilhaft.

Konstruktion eines für Erythropoietin-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pEPOFc.

Diese Konstruktion erfolgte analog zu der im Beispiel 2 beschriebenen (Abschnitt: "Konstruktion eines für IL-4-Rezeptor-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pIL-4Rfc"). Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der Nähe des Initiationskodons (A: 5'GATCGATCTCGAGATGGGGTGACGAATGTCCTCGCTGAGCTGTGG 3') bzw. des Stopkodons (B: 5' CTGGAATCGGATCCCCGTCTCGTAGGGCTCCCTGTGTACAGC 3') der im Vektor pCES klonierten EPO-cDNA (EP A 0267 678) hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 7. Nach erfolgter Amplifizierung liegt mittels thermostabiler DNA-Polymerase ein DNA-Fragment vor (598 bp), das bezogen auf den kodierenden Strang am 5'-Ende vor dem Initiationskodon eine XhoI-Stelle enthält und in dem am 3'-Ende das Kodon für den vorletzten C-terminalen Aminosäurerest von EPO (Asp) in einer BamHI-Erkennungssequenz vorliegt. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der EPO-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit XhoI und BamHI in den oben beschriebenen mit XhoI/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pEPOFc (Fig. 8).

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Lösliches Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulin-

sen IgG, IgM, IgA und IgE.

2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls über seine Hinge-Region mit dem extrazellulären Teil vom Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor verbunden ist.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG besteht.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG1 oder einem Protein A-bindenden Fragment davon besteht.
5. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte kodierende DNA in ein Säugerzell-expressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
6. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-4 zur Diagnostik in vitro.
7. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1-4 als Arzneimittel.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : ES

1. Verfahren zur Herstellung von löslichen Fusionsproteinen, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte kodierende DNA in ein Säugerzell-expressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls über seine Hinge-Region mit dem extrazellulären Teil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor verbunden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von hu-

manem IgG besteht.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG1 oder einem Protein A-bindenden Fragment davon besteht.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : GR

1. Lösliches Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE.
2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls über seine Hinge-Region mit dem extrazellulären Teil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor verbunden ist.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG besteht.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG1 oder einem Protein A-bindenden Fragment davon besteht.
5. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese konstruierte kodierende DNA in ein Säugerzellexpressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
6. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-4 zur Diagnostik in vitro.

Claims

Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. A soluble fusion protein consisting of the extracellular portion of human tumour necrosis factor receptor or a functional part thereof and of a necessary part of an immunoglobulin molecule selected from one of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA

and IgE.

2. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule is connected via its hinge region to the extracellular part of the tumour necrosis factor receptor.
3. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG.
4. A fusion protein as claimed in claim 3, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG1 or a protein A-binding fragment thereof.
5. A process for preparing fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4, which comprises introducing the DNA coding for these constructs into a mammalian cell expression system and, after expression, purifying the fusion protein which has been formed by affinity chromatography via the immunoglobulin portion.
6. The use of the fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4 for in vitro diagnosis.
7. A fusion protein as claimed in any of claims 1 - 4 as pharmaceutical.

Claims for the following Contracting State : ES

1. A process for preparing soluble fusion proteins consisting of the extracellular portion of human tumour necrosis factor receptor or a functional part thereof and of a necessary part of an immunoglobulin molecule selected from one of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA and IgE, which comprises introducing the DNA coding for these constructs into a mammalian cell expression system and, after expression, purifying the fusion protein which has been formed by affinity chromatography via the immunoglobulin portion.
2. A process as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule is connected via its hinge region to the extracellular part of the tumour necrosis factor receptor.
3. A process as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG.
4. A process as claimed in claim 3, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG1 or

protein A-binding fragment thereof.

Claims for the following Contracting State : GR

1. A soluble fusion protein consisting of the extracellular portion of human tumour necrosis factor receptor or a functional part thereof and of a necessary part of an immunoglobulin molecule selected from one of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA and IgE.

2. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule is connected via its hinge region to the extracellular part of the tumour necrosis factor receptor.

3. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG.

4. A fusion protein as claimed in claim 3, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG1 or a protein A-binding fragment thereof.

5. A process for preparing fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4, which comprises introducing the DNA coding for these constructs into a mammalian cell expression system and, after expression, purifying the fusion protein which has been formed by affinity chromatography via the immunoglobulin portion.

6. The use of the fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4 for in vitro diagnosis.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Protéine de fusion soluble, constituée du segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale humaine, ou d'un fragment fonctionnel de celui-ci, et d'un segment Fc d'une molécule d'immunoglobuline, choisie dans l'une des classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE.

2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline est relié par sa région charnière au segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale.

3. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG humaine.

4. Protéine de fusion selon la revendication 3, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG1 humaine ou d'un fragment de celle-ci se liant à la protéine A.

5. Procédé pour la production de protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'ADN codant pour ces produits de construction est introduit dans un système d'expression de type cellule de mammifère, et, après expression de la protéine de fusion formée, est purifié par chromatographie d'affinité sur le segment d'immunoglobuline.

6. Utilisation des protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, pour le diagnostic in vitro.

7. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, en tant que médicament.

Revendications pour l'Etat contractant suivant : ES

1. Procédé pour la production de protéines de fusion solubles, constituées du segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale humaine, ou d'un fragment fonctionnel de celui-ci, et d'un segment Fc d'une molécule d'immunoglobuline, choisie dans l'une des classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE, caractérisé en ce que l'ADN codant pour ces produits de construction est introduit dans un système d'expression de type cellule de mammifère, et, après expression de la protéine de fusion formée, est purifié par chromatographie d'affinité sur le segment d'immunoglobuline.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline est relié par sa région charnière au segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG humaine.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG1 humaine ou un fragment de celle-ci se liant à la protéine A.

Revendications pour l'Etat contractant suivant : GR

1. Protéine de fusion soluble, constituée du segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale humain, ou d'un fragment fonctionnel de celui-ci, et d'un segment Fc d'une molécule d'immunoglobuline choisie dans l'une des classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE. 5
2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline est relié par sa région charnière au segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale. 10
3. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG humaine. 15
4. Protéine de fusion selon la revendication 3, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG1 humaine ou un fragment de celle-ci se liant à la protéine A. 20
5. Procédé pour la production de protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'ADN codant pour ces produits de construction est introduit dans un système d'expression de type cellules mammaliennes, et, après expression de la protéine de fusion formée, est purifié par chromatographie d'affinité sur le segment d'immunoglobuline. 25
6. Utilisation des protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, pour le diagnostic in vitro. 30

40

45

50

55

EP 0 464 533 B1

Fig. 1

```

      GTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGCTTCGCCAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CAGCGAGCCTGCGAGGACGAGCCGACCCAGAAGCGGGTCCACCGGCCGCGAAGTCCGTGA
      <*****
                                Oligonukleotid 1
  
```

```

      ACAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TGTATTGACACCGTCGTATATTAATTGAACCTTTAGTTGATTAAAGTTCTGTAAAC
      *****|
  
```

```

-----
                                Oligonukleotid 2
      |*****>
      AACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTGATGACAAAGTCACAAGTTCGTCACTAAGGGAGGGCTTGTCATTGGCCTTCTCATGT
      780
  
```

EP 0 464 533 B1

Fig. 2

```

      10              30              50
GCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTCGGCGAACCC
      70              90              110
CTCGCACTCCCTCTGGCCGGCCAGGGCGCTTCAGCCCAACCTCCCAGCCCCACGGGC
      130             150             170
GCCACGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCAACTGGTAGACATGGAGACCCCTGCCTGGCCC
                               MetGluThrProAlaTrpPro
      190             210             230
CGGGTCCCGCGCCCCGAGACCGCGCTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGCTCTCGCC
ArgValProArgProGluThrAlaValAlaArgThrLeuLeuLeuGlyTrpValPheAla
      250             270             290
CAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACCTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTGGAAA
GlnValAlaGlyAlaSerGlyThrThrAsnThrValAlaAlaTyrAsnLeuThrTrpLys
      310             330             350
TCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTAATCAAGTCTACACT
SerThrAsnPheLysThrIleLeuGluTrpGluProLysProValAsnGlnValTyrThr
      370             390             410
GTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGAAAAGCAAATGCTTTACACAACAGACACA
ValGlnIleSerThrLysSerGlyAspTrpLysSerLysCysPheTyrThrThrAspThr
      430             450             470
GAGTGTGACCTCACCACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTC
GluCysAspLeuThrAspGluIleValLysAspValLysGlnThrTyrLeuAlaArgVal
      490             510             530
TTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGAGCCTCTGTATGAG
PheSerTyrProAlaGlyAsnValGluSerThrGlySerAlaGlyGluProLeuTyrGlu
      550             570             590
AACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGT
AsnSerProGluPheThrProTyrLeuGluThrAsnLeuGlyGlnProThrIleGlnSer

```

EP 0 464 533 B1

Fig. 2 (Fortsetzung)

610 630 650
 TTGGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGA
 PheGluGlnValGlyThrLysValAsnValThrValGluAspGluArgThrLeuValArg
 670 690 710
 AGGAACAACACTTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTGGCAAGGACTTAATTTATACACTT
 ArgAsnAsnThrPheLeuSerLeuArgAspValPheGlyLysAspLeuIleTyrThrLeu
 730 750 770
 TATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAGAAAAACAGCCAAAAACAACACTAATGAGTTT
 TyrTyrTrpLysSerSerSerSerGlyLysLysThrAlaLysThrAsnThrAsnGluPhe
 790 810 830
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCC
 LeuIleAspValAspLysGlyGluAsnTyrCysPheSerValGlnAlaValIleProSer
 850 870 890
 CGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGG
 ArgThrValAsnArgLysSerThrAspSerProValGluCysMetGlyGlnGluLysGly
 910 930 950
 GAATTCAGAGAAATATTCACATCATTGGAGCTGTGGTATTTGTGGTCATCATCTTGTGTC
 GluPheArgGluIlePheTyrIleIleGlyAlaValValPheValValIleIleLeuVal
 970 990 1010
 ATCATCTGGCTATATCTCTACACAAGTGTAGAAAGCAGGAGTGGGCAGAGCTGGAAG
 IleIleLeuAlaIleSerLeuHisLysCysArgLysAlaGlyValGlyGlnSerTrpLys
 1030 1050 1070
 GAGAACTCCCCACTGAATGTTTCATAAAGGAAGCACTGTTGGAGCTACTGCAAAATGCTAT
 GluAsnSerProLeuAsnValSer
 1090 1110 1130
 ATTGCACGTGTACCGAGAACTTTTAAGAGGATAGAATACATGGAAACGCAATGAGTATT
 1150 1170 1190
 TCGGAGCATGAAGACCCTGGAGTTCAAAAAAGCTTTGATATGACCTGTTATTACCATTAG

EP 0 464 533 B1

Fig. 2 (Fortsetzung)

1210	1230	1250
CATTCTGGTTTTGACATCAGCATTAGTCACCTTTGAAATGTAACGAATGGTACTACAACCA		
1270	1290	1310
ATTCCAAGTTTTAATTTTTAACCCATGGCACCTTTGCACATAACATGCTTTAGATTAT		
1330	1350	1370
ATATTCGCGACTTAAGGATTAACCAGGTCGTCCAAGCAAAACAAATGGGAAATGCTT		
1390	1410	1430
AAAAAATCCTGGGTGGACTTTTGAAAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC		
1450	1470	1490
TTGCTCTGTGTGCCAGGCTGGAGTGCAGTAGCACGATCTCGGCTCACTTGCAACCCCTCCGT		
1510	1530	1550
CTCTCGGGTTCAAGCAATTGTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGCGC		
1570	1590	1610
ACTACCACGCCAAGCTAATTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATCTTGCC		
1630	1650	1670
CAGGCTGGTCTTGAATTCCTGACCTCAGTGATCCACCCACCTTGGCTCCCAAAGATGT		
1690	1710	1730
AGTATTATGGGCGTGAACCACCATGCCAGCCGAAAAGCTTTTGAGGGGCTGACTTCAAT		
1750	1770	1790
CCATGTAGGAAAGTAAATGGAAGGAAATTGGGTGCATTTCTAGGACTTTTCTAACATAT		
1810	1830	1850
GTCTATAATATAGTGTTAGGTTCTTTTTTTTTTTCAGGAATACATTGGAAATCAAAAC		
1870	1890	1910
AATTGGGCAAACTTTGTATTAATGTGTTAAGTGCAGGAGACATTGGTATTCTGGGCAGCT		

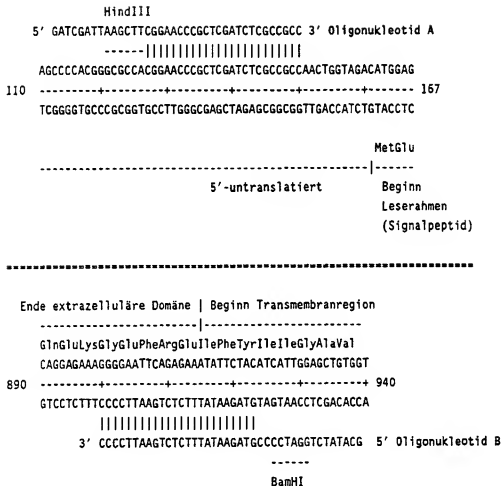
EP 0 464 533 B1

Fig. 2 (Fortsetzung)

1930	1950	1970
TCCTAATATGCTTTACAATCTGCACITTAAGTGACTTAAGTGGCATTAAACATTGAGAG		
1990	2010	2030
CTAACTATATTTTATAAGACTACTATACAACTACAGAGTTTATGATTAAAGGTACTTA		
2050	2070	2090
AAGCTTCTATGGTTGACATTGTATATATAATTTTTAAAAAGGTTTTCTATATGGGGAT		
2110	2130	2150
TTTCTATTTATGTAGGTAATTTGTTCTATTTGTATATATTGAGATAATTTATTTAATAT		
2170		
ACTTTAAATAAAGGTGACTGGGAATTGTT		

EP 0 464 533 B1

Fig. 3



EP 0 464 533 B1

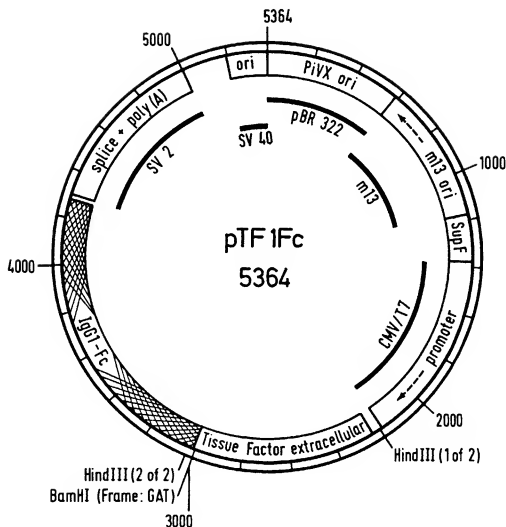


Fig. 4

Fig. 5

[illegible]

EP 0 464 533 B1

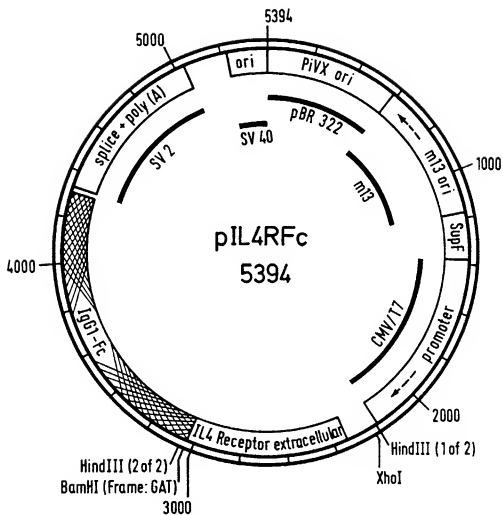


Fig. 6

EP 0 464 533 B1

Fig. 2

XhoI

5' GATCGATCTCGAGATGGGGGTGCACGAATGCTGCCTGGCTGTGG 3' Oligonukleotid A

-----|

ATGGGGGTGCACGAATGCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGG

182 -----+-----+-----+-----+-----+----- 235

TACCCCCACGTGCTTACAGGACGGACCGACACCAGAGAGGACAGGGACGACAGC

MetGlyValHisGluCysProAlaTrpLeuTrpLeuLeuLeuSerLeuLeuSer -

Beginn Leserahmen (Signalpeptid)

Ende Leserahmen-----|

LeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArgEnd

-----|

GCTGTACACAGGGGAGGCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCCACCTGGGC

724 -----+-----+-----+-----+-----+----- 783

CGACATGTGTCCCTCCGGACGTCTGTCCCTGTCTACTGGTCCACACAGGTGGACCCG

|||||

3' CGACATGTGTCCCTCCGGACGTCTGTCCCTAGGCTAAGGTC 5' Oligonukleotid B

BamHI

EP 0 464 533 B1

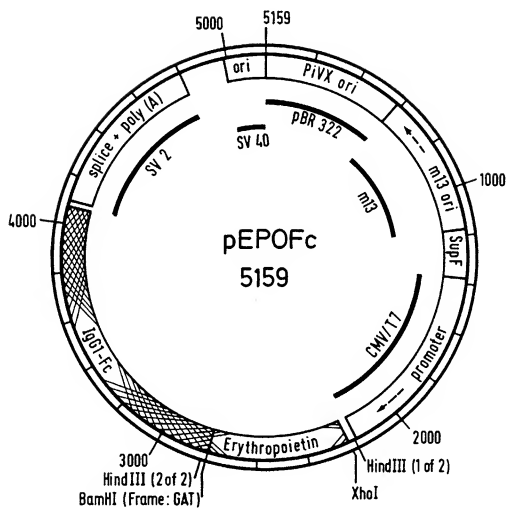


Fig. 8